

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimental dengan memberikan perlakuan konsentrasi dan waktu inkubasi yang berbeda-beda (Fathoni, 2006).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena penelitian dilakukan di laboratorium dan kondisi yang homogen. Pada pengujian aktivitas antispore digunakan konsentrasi ekstrak *B. rotunda* sebesar 0%, 1%, dan 2% terhadap spora *B. cereus* dan *B. subtilis*. Sedangkan pada pengujian *disc-diffusion* digunakan konsentrasi 1%, dan 10%, dengan *chlorhexidine* 1% merupakan kontrol positif serta DMSO 10% merupakan kontrol negatif. Pada uji MIC dan MBC konsentrasi pengujian yang digunakan berdasarkan teknik pengenceran dalam mg/ml adalah 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.0781, 0.0390, dan 0.0195, dengan kontrol positif berupa medium sebanyak 200 µl dan kontrol negatif berupa inokulum sebanyak 200 µl. Setiap konsentrasi uji dan kontrol terdapat pengulangan sebanyak minimal 2 kali pengulangan (Zainin *et al.*, 2013).

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman *B. rotunda* atau temukunci, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah rimpang dari tanaman *B. rotunda*.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dimulai dari tanggal 1 April 2015 sampai dengan tanggal 28 April 2015 yang dilaksanakan di *Institute of Biosains* (IBS), Universiti Putra Malaysia (UPM), Serdang, Malaysia.

Puji Nurhayat, 2015

Potensi Aktivitas Antibakteri Ekstrak Temukunci (Boesenbergia rotunda) Terhadap Sel Vegetatif Serta Spora Bacillus cereus dan Bacillus subtilis

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut.

Tabel 3.1. Alat-alat penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Botol Duran	500 ml	3 buah
2	Timbangan	Sartorius BSA224S-CW	1 buah
3	<i>Autoclave</i>	Tomy SX-500	1 buah
4	Spatula		2 buah
5	Cawan Petri	Disposable	51 buah
6	Laminar	ESCO Smart Programme SC2-4A1 dan ESCO Class II EQU/04-EBC-2A	2 buah
7	Parafilm	Merk M	1 box
8	<i>Ose/Loop</i>	Disposable dan non-disposable	3 buah
9	<i>Cotton bud</i>		4 buah
10	Destilator	Sartorius stedim biotech arium 611DI	1 buah
11	Erlenmeyer	Bomex	2 buah
12	Tips	Ukuran 10-100 μ L dan 100-1000 μ L Eppendorf	@ 3 box
13	Tabung Mikro	Eppendorf 1.5 ml	60 buah
14	Bunsen Elektrik	Fireboy ECO	1 buah
15	Inkubator	Memmert GmbH + Co.KG IN55	1 buah
16	Lemari pendingin	Merk berjaya	1 buah
17	Sarung tangan	Vandaier, Malaysia	1 box
18	Penggaris	TENTH	1 buah
19	<i>HiAntibiotic Zone Scale</i>	HiMedia, Mumbai 400 086, India	1 buah
20	Mikropipet	Uk. 10-100 μ L eppendorf, PhysioCare, Germani	1 buah
21	<i>Fortex Mixer</i>	BioGote	1 buah
22	Botol universal		2 buah
23	Mikrotiter	Cellstar No. 650 185 Greiner bio-one	2 buah
24	Mikropipet	Uk. 100-1000 μ L eppendorf, PhysioCare, Germani	1 buah
25	Gelas ukur	Ukuran 2 liter	1 buah
26	Kamera	Cannon dan Nikon	1 buah
27	Alat tulis	<i>Log book</i> , pensil, pulpen, dan penghapus	1 set
28	Oven	Memmert IN55, Germany	1
29	<i>Centrifuge</i>	Sartorius, 1-14, UPM	1
30	Evaporator	Buchi, R-3.	1
31	Tabung centrifuge	Ukuran 50 ml	2

Tabel 3.2. Bahan-bahan penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Tryptic Soy Broth (TSB)	BD, Dickinson and Company, MD 21152 USA	15 g
2	Agar	Merk KgaA, Darmstadt, Germany	21 g
3	Akuadest (dH ₂ O)		1700 ml
4	Alumunium foil	My Chef, Malaysia.	1 gulung
5	Cakram 6 mm	Dibuat dari kertas Whatman cat no.1001 125	1 toples
6	Inokulum <i>Bacillus cereus</i>	Strain ATCC33019, IBS	1 plate
7	Inokulum <i>Bacillus subtilis</i>	Strain ATCC6633, IBS	1 plate
8	DMSO 100%		2 ml
9	Ekstrak Temukunci 1%	Dari IBS UPM	20 µl
10	Ekstrak Temukunci 10%	Dari IBS UPM	20 µl
13	<i>Chlorhexidine</i>		20 µl
14	Mueller Hinton Broth (MHB)	Beckton Dickinson, Spark, MD 21152 USA	14 g
15	NaCl 0,95%	R & M Chemicals, Essex, USA PHOU27814	4,75 g
16	Alkohol 70%		100 ml
17	Nutrien Broth (NB)	Merck KgaA, 1-05443-0500 Germany.	4 g
18	Metanol 100%	QreC, Grad AR, Malaysia	400 ml
19	Kertas saring	Whatman no.1	1 box

F. Cara Kerja

1. Strain Bakteri dan Sampel Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan berupa serbuk *B. rotunda* yang telah kering. Pada penelitian ini digunakan pula strain bakteri *Bacillus cereus* ATCC33019 dan *B. subtilis* ATCC6633 yang diperoleh dari IBS (*Institute of Biosains*), UPM, Serdang, Malaysia. Strain bakteri ditumbuhkan pada *Tryptic Soy Agar* (TSA) dengan suhu 37°C selama 24 jam.

2. Preparasi Medium dan Sterilisasi

Alat dan bahan disiapkan termasuk diantaranya medium, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* Tomy SX-500 dengan suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang dipersiapkan diantaranya *Tryptic Soy Broth* (TSA), *Mueller*

Hinton Broth (MHB), dan *Nutrient Agar* (NA). Takaran dalam membuat TSA terdiri dari 30 g *Tryptic Soy Broth* (TSB) merk Becton, USA dan 14 g agar Merck KgaA, Germany dalam 1 L akuades. Sedangkan, untuk pembuatan MHB terdiri dari MHB instan merk Becton Dickinson, USA sebanyak 21 g untuk 1 L akuades dengan pH akhir 7.3 ± 0.1 . Terakhir, untuk membuat NA terdiri dari 8 g *Nutrient Broth* (NB) Merck KgaA, Germany, 14 g agar Merck KgaA, dan akuades 1 L.

3. Preparasi Ekstrak

Serbuk tanaman *B. rotunda* kering (100 g) dimaserasi pada 400 ml metanol 100% (v / v) selama 3 hari pada suhu ruangan. Pada proses ekstraksi *B. rotunda* digunakan metanol karena biasanya metanol memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut lain seperti heksana dan air (Erlina *et al.*, 2012). Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 1 dan kemudian diekstraksi dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* (Buchi, Rotavor R-3) pada suhu 50°C, rendemen ekstrak methanol (Rukayadi *et al.*, 2008). Ekstrak dilarutkan dalam *dimethylsulfoxide* (DMSO) 100% yang kemudian digunakan sebagai larutan stok. Konsentrasi akhir dari ekstrak yang digunakan adalah 10 mg/ml atau 1% dan 100 mg/ml atau 10%. Pada penelitian ini DMSO 100% tidak dapat membunuh bakteri yang diuji. Oleh karena itu, DMSO dapat digunakan sebagai kontrol negatif dalam pengujian.

4. Preparasi Spora

Bacillus subtilis ATCC6633 dan *B. cereus* ATCC33019 merupakan strain bakteri yang digunakan dalam pengujian. *B. subtilis* dan *B. cereus* ditumbuhkan pada TSA dengan suhu 37°C selama lebih dari 1 minggu untuk mendapatkan spora dari kedua bakteri tersebut. Setelah dipanen, spora dan sel vegetatif *B. cereus* dan *B. subtilis* disuspensikan dalam 40 ml larutan NaCl 0.95% (steril), dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 90 menit untuk membunuh sel vegetatif. Kemudian, masing-masing suspensi bakteri dipindahkan ke dalam tabung mikro sampai habis. Suspensi bakteri disentrifugasi pada 4500 rpm selama 5 menit dan dicuci 2 kali menggunakan larutan NaCl 0.95% sebanyak 1 ml. Kemudian

dilakukan proses penghitungan spora untuk memperoleh 30 – 300 spora per cawan. Di samping itu, dilakukan pula proses pewarnaan endospora. Spora pada hasil pewarnaan akan menunjukkan warna hijau, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah (Kida *et al.*, 2004; dan Rukayadi *et al.*, 2009 dengan modifikasi).

5. Tes Antibakteri

a. *Disc-diffusion test*

Ekstrak *B. rotunda* digunakan dalam *disc-diffusion* bertujuan untuk uji aktifitas antibakteri terhadap *B. cereus* and *B. subtilis*. Kedua bakteri tersebut dikultur selama 24 jam. Kemudian kultur ditumbuhkan dan disebarakan pada TSA menggunakan *cotton bud* steril. Kertas cakram steril (6 mm) ditetesi ekstrak *B. rotunda* sebanyak 10 µl pada masing-masing konsentrasi pengujian dan kontrol. DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif dan *chlorhexidine* (CHX) 1% digunakan sebagai kontrol positif. Pada pengujian digunakan konsentrasi ekstrak sebesar 1% dan 10%. Cawan petri yang telah berisi cakram uji serta kontrol diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, setelah itu diobservasi dan dihitung hasil zona hambat yang terbentuk pada area cakram. Data diisi pada Tabel 3.3. Data hasil yang didapat dirata-ratakan dan diuji statistik menggunakan SPSS versi 16 yaitu menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji *One-way* ANOVA untuk mengetahui nilai signifikansi antar konsentrasi dengan kontrol dan uji T untuk mengetahui perbandingan antara kedua bakteri uji.

Tabel 3.3. *Disc-diffusion*

No.	Konsentrasi Ekstrak / Kontrol	Zona Hambat (mm)	
		<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
1	<i>B. rotunda</i> 1%		
2	<i>B. rotunda</i> 10%		
3	DMSO 10% (-)		
4	<i>Chlorhexidine</i> (CHX) 1% (+)		

b. MIC dan MBC

Minimum inhibitory concentration (MIC) atau konsentrasi penghambatan minimum dari ekstrak *B. rotunda* terhadap *B. cereus* dan *B. subtilis* dilakukan berdasarkan deskripsi metode dalam pedoman *Clinical Laboratory Standard*

Institute (CLSI) M7-A6 (2003). Pengujian dilakukan pada 24 sumur pada mikrotiter dengan menggunakan metode *broth microdilution* (mikro pengenceran broth) dengan inokulum yang dikisarkan 10^6 CFU/ml. Setiap dua kali pengenceran dari larutan stok ekstrak *B. rotunda* dicampur dengan organisme yang diuji dalam medium *Mueller Hinton Broth* (MHB). Sumur no. 1 merupakan kontrol positif (hanya terdiri dari medium sebanyak 200 μ l) dan sumur no. 2 merupakan kontrol negatif (hanya terdiri dari inokulum sebanyak 200 μ l). Sedangkan sumur no. 12 pada mikrotiter berisi konsentrasi tertinggi dari ekstrak yang diuji, dan secara berurutan sampai sumur no. 3 berisi konsentrasi terendah dari ekstrak yang diuji. Setiap pengujian dan kontrol dilakukan duplikasi. Mikrotiter yang berisi pengujian dan kontrol kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil MIC menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dari agen antibakteri menghasilkan penghambatan yang sempurna pada pertumbuhan secara visual. Ekstrak diencerkan dengan menggunakan DMSO 100% dan konsentrasi DMSO menurun secara berkala dimulai dari dua kali pengenceran pada sumur mikrotiter (Zainin *et al.*, 2013).

Minimum bactericidal concentration (MBC) atau konsentrasi bakterisidal minimum menggambarkan konsentrasi terendah dari agen antibakteri dimana tidak ada pertumbuhan bakteri pada medium *Mueller Hinton Agar* (MHA). Pengujian MBC diambil dari subkultur pada suspensi yang diujikan saat MIC sebanyak masing-masing 10 μ l setiap sumur kemudian ditetaskan pada cawan yang telah berisi MHA. Semua sumur yang terdiri dari kontrol positif (nomor 1) dan kontrol negatif (nomor 2) serta masing-masing konsentrasi pengenceran dipipet pada medium agar. Kemudian semua cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam atau sampai bakteri pada kontrol positif tumbuh pada medium. Pengujian MBC dilakukan pada semua strain bakteri yang diuji, yaitu *B. cereus* dan *B. subtilis* (Zainin *et al.*, 2013). Data hasil MIC dan MBC diisi pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4. Data MIC dan MBC.

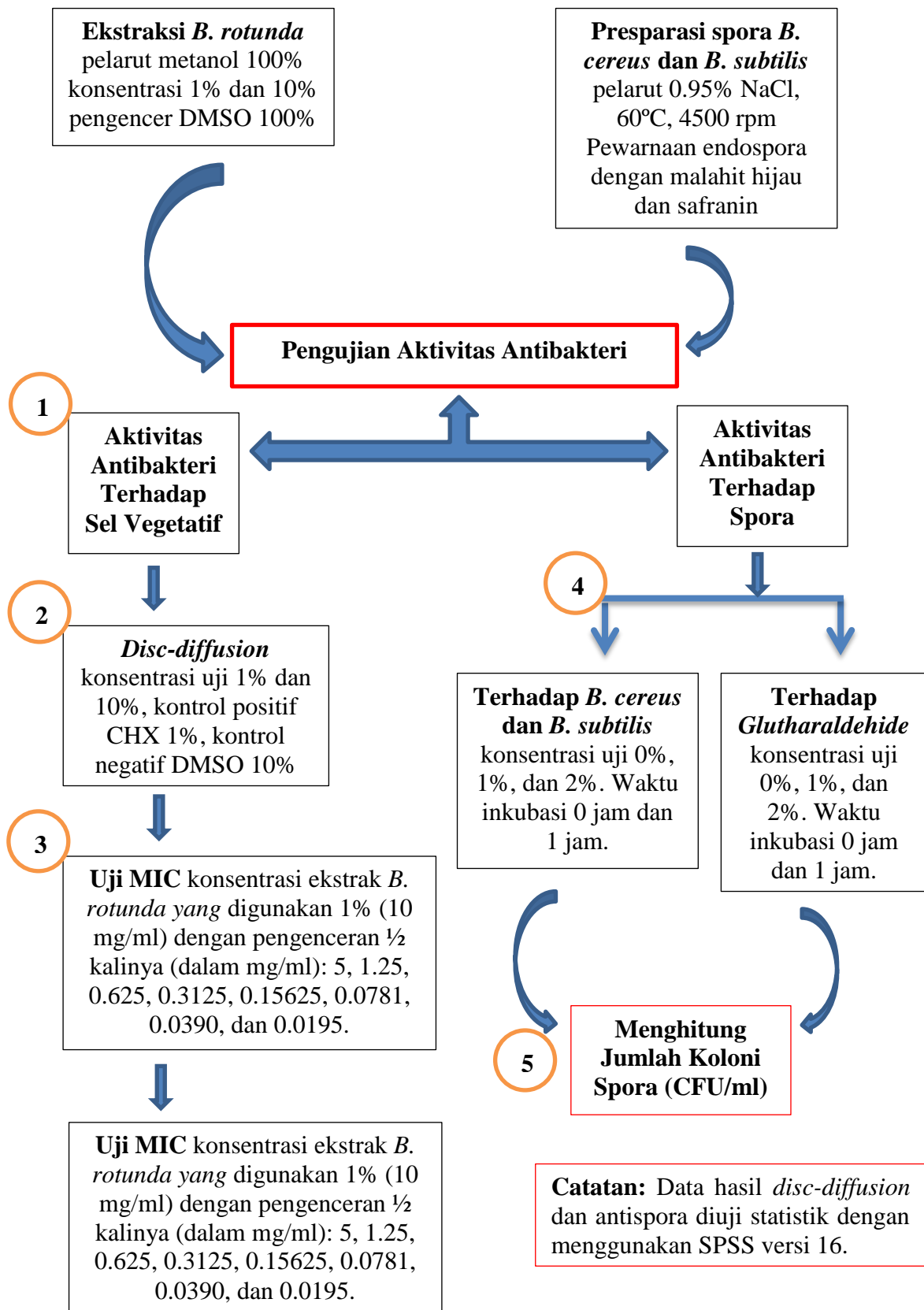
No.	Nama Bakteri	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
1	<i>B. cereus</i> ATCC33019		
2	<i>B. subtilis</i> ATCC6633		

6. Menentukan Aktivitas Antispora

Pengujian aktivitas antispora dilakukan berdasarkan Kida *et al.* (2004) dan Rukayadi *et al.* (2009) dengan modifikasi. Pasta atau konsentrat ekstrak *B. rotunda* diencerkan dengan menggunakan DMSO 100% sampai diperoleh ekstrak *B. rotunda* 10%. *Glutaraldehyde* 10% digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian aktifitas antispora atau aktifitas sporisidal. Suspensi spora yang telah disiapkan kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:100 pada NaCl 0.95%, sehingga rendemen tersebut sekarang telah berisi 10^6 spora/ml. Konsentrasi pengujian dari ekstrak *B. rotunda* yang disiapkan adalah 0.00%, 1.00%, and 2.00% yang diujikan bersama dengan suspensi spora yang telah diencerkan. Untuk kontrol positif, yaitu *glutaraldehyde*, disiapkan juga konsentrasi 0.00%, 1.00%, dan 2.00%. Setiap 1 ml dari larutan uji diinkubasi pada *incubator shaker* 37°C dengan waktu inkubasi yang berbeda. Waktu inkubasi dalam penelitian ini digunakan 0 jam dan 1 jam, kemudian 100 µl larutan dipindahkan pada tabung tabung mikro yang telah berisi 900 µl NaCl 0,95% dan diencerkan dari 10^{-1} sampai 10^{-2} . Untuk setiap serial konsentrasi dari ekstrak *B. rotunda* dan *glutaraldehyde*, diambil masing-masing 25 µl dari pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} yang kemudian disebarkan pada medium cawan berisi *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dan nilai rata-rata CFU/ml dihitung. Data diisi pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5. Jumlah koloni spora *Bacillus cereus* atau *Bacillus subtilis*

Konsentrasi <i>B. rotunda</i> (%)	Jumlah koloni <i>B. cereus</i> atau <i>B. subtilis</i> (CFU/ml)							
	0 jam				1 jam			
	10^{-1}		10^{-2}		10^{-1}		10^{-2}	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
0								
1								
2								



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

Puji Nurhayat, 2015

Potensi Aktivitas Antibakteri Ekstrak Temukunci (*Boesenbergia rotunda*) Terhadap Sel Vegetatif Serta Spora *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu